

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

(Translation)

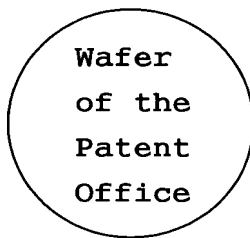
PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following  
application as filed with this Office.

Date of Application : November 30, 1999

Application Number : Patent Appln. No. 1999-340322

Applicant(s) : CanBas Co., Ltd.



April 8, 2004

Yasuo IMAI

Commissioner,  
Patent Office

Seal of  
Commissioner  
of  
the Patent  
Office

Appln. Cert. No.

Appln. Cert. Pat. 2004-3028729

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 1 9 9 9 年 1 1 月 3 0 日

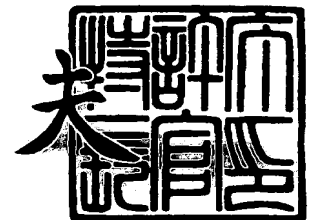
出 願 番 号  
Application Number: 平成 1 1 年 特 許 願 第 3 4 0 3 2 2 号  
[ST. 10/C]: [ J P 1 9 9 9 - 3 4 0 3 2 2 ]

出 願 人  
Applicant(s): 株式会社キャンバス

2 0 0 4 年 4 月 8 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 2 8 7 2 9

【書類名】 特許願

【整理番号】 NP99464-YS

【提出日】 平成11年11月30日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K 38/00

【発明の名称】 抗癌療法の増強剤とそのスクリーニング方法

【請求項の数】 13

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県名古屋市瑞穂区密柑山町 1 - 4 4 - 1  
                                コーポ岡田 3 0 5 号

    【氏名】 河邊 拓己

【発明者】

    【住所又は居所】 愛知県豊田市渋谷町 1 - 1 - 1 6

    【氏名】 菅沼 正司

【特許出願人】

    【識別番号】 396020800

    【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

    【識別番号】 100093230

    【弁理士】

    【氏名又は名称】 西澤 利夫

    【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

    【予納台帳番号】 009911

    【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

    【物件名】 明細書 1

    【物件名】 図面 1

    【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 抗癌療法の増強剤とそのスクリーニング方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド、G 2 期停止に関与するリン酸化酵素、および標識化リン供与体からなるリン酸化反応系に候補物質を添加し、オリゴペプチドのリン酸化を阻害する物質を選択することを特徴とする抗癌療法の細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質のスクリーニング方法。

【請求項 2】 リン酸化酵素が、hChk1、HuCdsl/Chk2、またはこれら酵素と他の蛋白質との融合蛋白質、もしくはDNA傷害細胞の抽出液である請求項 1 のスクリーニング方法。

【請求項 3】 配列番号 1 における第 2 位および第 3 位XaaがGly、Leu、SerまたはArgであり、第 6 ～ 8 位XaaがGly、Leu、Ser、Met、ProまたはGluである請求項 1 のスクリーニング方法。

【請求項 4】 配列番号 1 における第 2 位XaaがGly、Leu、SerまたはArg、第 3 位XaaがGly、LeuまたはSer、第 6 位XaaがGly、Met、ProまたはGlu、第 7 位XaaがGly、LeuまたはPro、第 8 位XaaがGly、Met、SerまたはGluである請求項 3 のスクリーニング方法。

【請求項 5】 配列番号 1 における第 2 位XaaがArg、第 3 位XaaがSer、第 6 位XaaがMet、第 7 位XaaがPro、第 8 位XaaがGluである請求項 4 のスクリーニング方法。

【請求項 6】 リン酸化酵素が、hChk1、HuCdsl/Chk2、またはこれら酵素と他の蛋白質との融合蛋白質である請求項 3 から 5 のいずれかのスクリーニング方法。

【請求項 7】 細胞周期 G 1 期チェックポイント機構に欠損を有する細胞にDNA傷害性処置を施し、この細胞の培地に候補物質を添加して培養した後、G 2 /M期に相当するDNA量の細胞集団が増加しない物質を選択することを特徴とする細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質のスクリーニング方法。

【請求項 8】 DNA傷害性処置を施した細胞における G 2 /M期に相当す

る DNA 量の細胞集団を増加させず、かつ細胞周期 M 期停止を生じさせる薬剤処置によって G 2 / M 期に相当する DNA 量の細胞集団が増加する物質を選択する請求項 7 のスクリーニング方法。

【請求項 9】 請求項 1 から 8 の方法によって選択された細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質。

【請求項 10】 炭素、酸素および窒素からなる主鎖と、チロシン側鎖、プロリン側鎖およびアスパラギン側鎖を有する化合物である請求項 9 の細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質。

【請求項 11】 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチドである請求項 9 の細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質。

【請求項 12】 配列番号 2 における第 2 位および第 3 位 Xaa が Gly、Leu、Ser または Arg であり、第 5 ～ 8 位 Xaa が Ser、Gly、Met、Pro または Glu である請求項 11 の細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質。

【請求項 13】 請求項 9 から 12 のいずれかの細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質またはその誘導体を有効成分とする抗癌処置増強剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

この出願の発明は、細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質のスクリーニング方法と、この方法によって選択された細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質、並びにこの細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質を有効成分とする抗癌処置増強剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

温熱療法や、放射線または紫外線等の照射、あるいは抗癌剤（例えば、ブレオマイシンやシスプラチン等）の投与など、多くの抗癌処置は癌細胞に対する DNA 損傷を作用機序としている。しかしながら、これらの抗癌処置は、癌細胞も正常細胞も同様に傷害するため、癌患者はしばしば、激しい副作用に見舞われる。また、この副作用のために、十分な抗癌治療が行えない場合が多い。

## 【0 0 0 3】

一方、大半の正常ヒト細胞では、DNA 傷害が起こった場合には、細胞周期 G 1 期チェックポイントおよび G 2 期チェックポイントにおいて細胞周期を停止し、傷害を受けた DNA を修復するが、正常細胞における修復機能は G 1 期チェックポイントによる停止期に働くことが主であり、G 2 期チェックポイントの役割は少ないと考えられている。

## 【0 0 0 4】

分子腫瘍学における最近の進歩によって、G1細胞周期チェックポイントが大半のヒト癌細胞で損なわれていることが明らかにされている。癌細胞の大部分は、G 1 期チェックポイントに関係する p 53、Rb、p 16<sup>INK4</sup>や p 19<sup>ARF</sup>のような癌抑制遺伝子に突然変異や欠失を有するか、またはMDM-2 やサイクリン D のような癌遺伝子が過剰発現している（参考文献 1、2）。これらに加えて、増殖因子の過剰発現やこれら遺伝子、それらのレセプターまたは下流シグナル伝達分子の機能獲得突然変異によって引き起こされる過剰な増殖シグナルが、G1期チェックポイントを機能不全にすることによって細胞の形質転換を生じさせていると考えられる。例外的に、癌細胞のなかにはG1期チェックポイントではなくてG2期チェックポイントが破壊されているものもある（参考文献 3）。このことは、正常な細胞周期においては、G2期チェックポイントと比較してG1期チェックポイントが相対的に重要であることを示している。突然変異の過剰集積はおそらく細胞に致命的であるが、上記のチェックポイントの破壊による突然変異率の上昇により最終的に発癌に至る突然変異を細胞に集積させる（参考文献 4、5）。

## 【0 0 0 5】

興味深いことに、G1期チェックポイントが損なわれている癌細胞においてもG2期チェックポイントは保持されている。正常細胞はG1とG2の2つの独立したDNA損傷チェックポイントを有しているので、何らかの処理によってG2期チェックポイントが選択的に破壊された場合、G1期チェックポイントが既に破壊されている癌細胞は、無傷のG1期チェックポイントを有する正常細胞よりもDNA損傷処理に対して一層敏感になるものと期待される。例えば、カフェイン等による非特異的なG2期チェックポイント破壊はp 53欠失癌細胞をDNA損傷



に対して感受性にするのに有効であることが報告されている（参考文献 6 - 7）。

#### 【0 0 0 6】

G2期チェックポイントに関する現在の仮説によれば、DNA損傷はrad3+/ATMの活性化によってプロテインキナーゼChk1およびHuCds1/Chk2を活性化する（参考文献11-14）。次いで、Chk1およびHuCds1/Chk2はヒトではCdc25Cの216番セリンをリン酸化し、そして14-3-3との結合を促進する（参考文献15-17）。分裂酵母では、14-3-3とCdc25Cとの結合によってCdc25Cは細胞質中に隔離され（参考文献18）、その結果Cdc25CによるCdc2/サイクリンBの活性化が阻害されるので、最終的にG2停止が誘導され、DNAの修復が行われる（参考文献19-21）。

#### 【0 0 0 7】

##### 【発明が解決しようとする課題】

前記のとおり、G1期チェックポイントが損なわれている癌細胞においては、さらにG2期チェックポイントが選択的に破壊されれば、抗癌剤等のDNA傷害処理に対して感受性となり、効果的な癌治療が可能となるものと期待される。また、そのような治療においては、G1およびG2の2つのチェックポイント機構を持たない癌細胞を対象とすることになるため、比較的少ない量の抗癌剤によっても癌細胞を死滅させることが可能であり、正常細胞への副作用を大幅に低減することが可能となる。

#### 【0 0 0 8】

この出願は、以上のとおりの事情に鑑みてなされたものであって、細胞周期のG2チェックポイント機構を選択的に破壊することのできる新規な物質をスクリーニングする方法と、この方法により選択された細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質を提供することを課題としている。

#### 【0 0 0 9】

また、この出願は、この細胞周期G2期チェックポイント機構破壊物質を有効成分とする抗癌処置増強剤を提供することを課題としてもいる。

#### 【0 0 1 0】

**【課題を解決するための手段】**

この出願は、前記の課題を解決するものとして、以下の(1)～(13)の発明を提供する。

- (1) 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド、G 2 期停止に関与するリン酸化酵素、および標識化リン供与体からなるリン酸化反応系に候補物質を添加し、オリゴヌクレオチドのリン酸化を阻害する物質を選択することを特徴とする抗癌療法の細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質のスクリーニング方法。
- (2) リン酸化酵素が、hChk1、HuCds1/Chk2、またはこれら酵素と他の蛋白質との融合蛋白質、もしくはDNA傷害細胞の抽出液である前記発明(1)のスクリーニング方法。
- (3) 配列番号 1 における第 2 位および第 3 位XaaがGly、Leu、SerまたはArgであり、第 6 ～ 8 位XaaがGly、Leu、Ser、Met、ProまたはGluである前記発明(1)のスクリーニング方法。
- (4) 配列番号 1 における第 2 位XaaがGly、Leu、SerまたはArg、第 3 位XaaがGly、LeuまたはSer、第 6 位XaaがGly、Met、ProまたはGlu、第 7 位XaaがGly、LeuまたはPro、第 8 位XaaがGly、Met、SerまたはGluである前記発明(3)のスクリーニング方法。
- (5) 配列番号 1 における第 2 位XaaがArg、第 3 位XaaがSer、第 6 位XaaがMet、第 7 位XaaがPro、第 8 位XaaがGluである前記発明(4)のスクリーニング方法。
- (6) リン酸化酵素が、hChk1、HuCds1/Chk2、またはこれら酵素と他の蛋白質との融合蛋白質である前記発明(3)から(5)のいずれかのスクリーニング方法。
- (7) 細胞周期 G 1 期チェックポイント機構に欠損を有する細胞にDNA傷害性処置を施し、この細胞の培地に候補物質を添加して培養した後、G 2 /M期に相当するDNA量の細胞集団が増加しない物質を選択することを特徴とする細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質のスクリーニング方法。
- (8) DNA傷害性処置を施した細胞における G 2 /M期に相当するDNA量の細胞集団を増加させず、かつ細胞周期M期停止を生じさせる薬剤処置によって G 2 /M期に相当するDNA量の細胞集団が増加する物質を選択する前記発明(7)

のスクリーニング方法。

(9) 前記発明(1)から(8)の方法によって選択された細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質。

(10) 炭素、酸素および窒素からなる主鎖と、チロシン側鎖、プロリン側鎖およびアスパラギン側鎖を有する化合物である前記発明(9)の細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質。

(11) 配列番号 2 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチドである前記発明(9)の細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質。

(12) 配列番号 2 における第 2 位および第 3 位 Xaa が Gly、Leu、Ser または Arg であり、第 5 ～ 8 位 Xaa が Ser、Gly、Met、Pro または Glu である前記発明(11)の細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質。

(13) 前記発明(9)から(12)のいずれかの細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質またはその誘導体を有効成分とする抗癌処置増強剤。

#### 【 0 0 1 1 】

以下、これらの発明の実施形態について詳しく説明する。

#### 【 0 0 1 2 】

##### 【発明の実施の形態】

この出願の発明(1)のスクリーニング方法は、例えば以下のとおりに実施することができる。

#### 【 0 0 1 3 】

基質（配列番号 1 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド）、G 2 期停止に関与するリン酸化酵素、標識化リン供与体からなる in vitro リン酸化反応系に候補物質を添加し、基質のリン酸化を阻害する物質を選択する。このようにして選択された物質は、リン酸化酵素の活性を阻害することによって基質のリン酸化を阻害する物質であるため、細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質として特定することができる。

#### 【 0 0 1 4 】

標識化リン供与体としては、例えば、実施例に示したような、放射性同位元素 [32] P で標識した  $\gamma$ -A T P 等を用いることができる。また、細胞の G 2 期停止

に關与するリン酸化酵素としては、ヒト由来のリン酸化酵素hChk1またはHuCds1/Chk2の全長を用いることができる。また、これら酵素と他の蛋白質（例えばGSTやMBP等）との融合蛋白質を用いることができる。さらには、抗癌剤等のDNA傷害性処置によって刺激した細胞の抽出液を用いることもできる（以上、發明(2)）。

#### 【0015】

基質としてのオリゴペプチドは、具体的には、配列番号1における第2位および第3位XaaがGly、Leu、SerまたはArgであり、第6～8位XaaがGly、Leu、Ser、Met、ProまたはGluであるオリゴペプチド（發明(3)）である。さらに具体的には、配列番号1における第2位および第3位XaaがGly、Leu、SerまたはArgであり、第6～8位XaaがGly、Leu、Ser、Met、ProまたはGluであるオリゴペプチド（發明(4)）であり、最も具体的には、配列番号1における第2位XaaがArg、第3位XaaがSer、第6位XaaがMet、第7位XaaがPro、第8位XaaがGluであるオリゴペプチド（發明(5)：配列番号3）である。

#### 【0016】

この出願の前記發明(7)のスクリーニング方法は、例えば以下のとおりに実施することができる。

先ず、ヒト白血病細胞株Jurkat等の細胞周期G1期チェックポイント機構に欠損を有する細胞にDNA傷害性処置を施す。このDNA傷害性の処置としては、細胞の培地にブレオマイシン等の抗癌剤を添加したり、あるいは細胞に放射線を照射するなどの処置を例示することができる。そして、この細胞の培養培地に候補物質を添加し、10～48時間程度培養した後、細胞のDNA量を測定する。例えば、培養上澄を捨て、ヨウ化プロピジウムおよびNP-40等の界面活性剤溶液に細胞を浮遊させ、フローサイトメーターを用いて細胞のDNA量を測定することができる。このDNA量が、コントロール細胞のG2/M期と同等に増加している場合には、培地に添加した候補薬剤がG2期チェックポイント機構を破壊していないと判定する。一方、コントロール細胞のG2/M期と同等にDNA量を増加させない物質は、G2期チェックポイント機構破壊物質として特定される。

#### 【0017】

さらにこの出願の発明(8)のスクリーニング方法では、前記発明(7)の方法において選択された物質であって、かつ、細胞周期M期停止を生じさせる薬剤処置によって細胞のDNA量が増加する物質を選択する。すなわち、コルヒチン等のM期停止を生じさせる薬剤で細胞を処理して細胞周期をM期に停止させ、この細胞の培養培地に前記発明(7)で選択した物質を添加する。このとき、G 2 /M期と同等にDNA量を増加させる物質はM期での停止には影響を及ぼさず、G 2 期チェックポイント機構のみを選択的に破壊する物質として特定される。

#### 【0 0 1 8】

この出願の発明(9)は、以上のとおりの発明(1)～(8)のスクリーニング方法によって選択された細胞周期G 2 期チェックポイント機構破壊物質である。このような物質としては、炭素、酸素および窒素からなる主鎖と、チロシン側鎖およびプロリン側鎖を有する化合物（発明(10)）を例示することができる。例えば、図 1 B に構造を例示した化合物である。

#### 【0 0 1 9】

さらに、細胞周期G 2 期チェックポイント機構破壊物質としては、配列番号 2 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド（発明(11)）を例示することもできる。このようなオリゴペプチドは、例えば、配列番号 2 における第 2 位および第 3 位 Xaa が Gly、Leu、Ser または Arg であり、第 5 ～ 8 位 Xaa が Ser、Gly、Met、Pro または Glu であるオリゴペプチド（発明(12)）であり、具体的には図 1 A に構造を示した合成ペプチドである。このようなオリゴペプチドは、公知の固相ペプチド合成法等により調製することができる。

#### 【0 0 2 0】

発明(13)は、前記発明(9)～(12)の細胞周期G 2 期チェックポイント機構破壊物質を有効成分とする抗癌処置の増強剤である。この薬剤を癌組織に投与し、癌細胞のG 2 期チェックポイントを破壊すると同時に、抗癌剤投与等の抗癌処理を行うことによって癌細胞を死滅させる癌治療方法に用いることができる。すなわち、前記のG 2 期チェックポイント機構破壊物質は、G 2 期停止に関与するリン酸化酵素hChk1およびHuCds1/Chk2の活性を抑制するため、既にG 1 期チェックポイント機能を喪失している癌細胞は、G 2 期に停止してDNA修復を行うこ

とができず、抗癌剤等の処置をより有効に作用させることができる。この増強剤は、例えば、その有効成分である G 2 期チェックポイント機構破壊物質を適当な溶液担体に溶解するか若しくは分散させ、または適当な粉末担体と混合するかこれに吸着させるなどして製剤化することができる。

#### 【0 0 2 1】

以下、実施例を示してこの出願の前記発明についてさらに詳細かつ具体的に説明するが、この出願の発明は以下の例によって限定されるものではない。

#### 【0 0 2 2】

##### 【実施例】

##### 実施例 1

オリゴペプチド Y P N（配列番号 4）、A A A（配列番号 5）および 4 a a（配列番号 6）を公知の固相ペプチド合成法により作製した。

#### 【0 0 2 3】

$8 \times 10^5$  個の Jurkat 細胞を、10%牛胎児血清含有の RPMI1640 培地で、37℃、5%CO<sub>2</sub> で培養した。この培地に、さらに 10  $\mu$ g/ml のブレオマイシンと、20  $\mu$ g/ml のオリゴペプチド Y P N、A A A または 4 a a を加え、0、6、12、24 時間後に DNA 量を定量した。DNA の定量は、ヨウ化プロピジウムおよび NP-40 含有の緩衝液に細胞を浮遊し、フローサイトメーターにより行った。

#### 【0 0 2 4】

結果は図 2 に示したとおりである。この図 2 の左側はフローサイトメーターの測定結果であり、右側は DNA 量毎の細胞の割合を示すグラフである。

この図 2 の結果から明らかなように、オリゴペプチド Y P N を培地に添加した細胞が G 2 / M 期における DNA 量を増加させていないことが判明した。

#### 【0 0 2 5】

さらに、ブレオマイシンの代わりにコルヒチンを用いて同様に各細胞周期の DNA 量を定量した。結果は図 3 に示したとおりであり、ブレオマイシン処置では DNA 量が増加しなかったオリゴペプチド Y P N も、他のオリゴペプチドと同様にコルヒチン処理では DNA 量を増加させた。

#### 【0 0 2 6】

以上の結果から、オリゴペプチド Y P N は、細胞周期 G 2 期チェックポイント機構を特異的に破壊する物質であることが確認された。

#### 実施例 2

配列番号 7 のアミノ酸配列からなる合成ペプチドを基質、組換え hChk1 および HuCds1/Chk2 をリン酸化酵素とし、放射性同位元素 [32] P でラベルした  $\gamma$ -A T P を用いてリン酸化反応系に、オリゴペプチド T A T - S 216 A (配列番号 8) を加えて反応阻害を検出した。反応は、30℃ で 15 分間行い、その後 15% SDS-PAGE 法にて各ペプチドを分離し、オートラジオグラフィーにより反応阻害の程度を検出した。

#### 【 0 0 2 7 】

結果は図 4 に示したとおりであり、T A T - S 216 A は、組換え hChk1 および HuCds1/Chk2 による合成ペプチド (配列番号 7) のリン酸化反応を阻害した。

以上の結果から、オリゴペプチド T A T - S 216 A は細胞周期 G 2 期チェックポイント機構を特異的に破壊する物質であることが確認された。

#### 【 0 0 2 8 】

なお、T A T - S 216 A は、この出願の発明者らによる先願発明 (特願平 11-26 9398 号) の一つである。

#### 実施例 3

T A T 配列 (配列番号 4 - 6、8 および 9 の N 端 1 1 アミノ酸配列) に、表 1 に示した様々なアミノ酸配列を連結してオリゴペプチドを合成し、培養細胞における G 2 期チェックポイント機構の破壊効果 (実施例 1 と同様の方法)、hChk1 および HuCds1/Chk2 による基質ペプチド (配列番号 7) のリン酸化反応阻害効果、および各オリゴペプチドのリン酸化の程度を試験した。

#### 【 0 0 2 9 】

結果は表 1 に示したとおりである。

#### 【 0 0 3 0 】

#### 【表 1】

オリゴペプチド配列											DNA傷害後 G2チェックポイント阻害	hChk1またはHuCds1/Chk2による インビトロ磷酸化阻害	hChk1またはHuCds1/Chk2による 自身の磷酸化
1	YGRKKRRQRRR	L	A	R	S	A	S	M	P	E	A	L	-
2	YGRKKRRQRRR		Y	G	G	P	G	G	G	G	N		-
3	YGRKKRRQRRR		Y	L	S	R	S	P	P	M	N	E	+
4	YGRKKRRQRRR	R	Y	S	L	P	P	E	L	S	N	M	N.D.
5	YGRKKRRQRRR	L	Y	R	S	P	A	M	P	E	N	L	+
6	YGRKKRRQRRR	L	Y	R	S	P	S	M	P	E	N	L	+
7	YGRKKRRQRRR	G	G	R	S	P	A	M	P	E			N.D.
8	YGRKKRRQRRR	G	G	S	S	P	A	M	P				N.D.
9	YGRKKRRQRRR	G	G	R	S	P	S	M	P				N.D.
10	YGRKKRRQRRR	G	G	S	S	P	S	M	P				N.D.
11	YGRKKRRQRRR	G	G	S	S	P	A	M					N.D.
12	YGRKKRRQRRR	G	G	S	S	P	S	M					N.D.



## 【 0 0 3 1 】

## 実施例 3

ヒト胃癌細胞株 C O - 4 をヌードマウス皮下に接種し、その生着を確認した後、抗癌剤 CDDP (1.5 mg/kg) または 5-FU (20 mg/kg) を腹腔内に投与するとともに、オリゴペプチド T A T - S 216 (配列番号 9) 20 mg/kg を 0.5  $\mu$  l を週 3 回または 5 回、腫瘍に局所注射し、腫瘍を切除し、重量を測定した。

## 【 0 0 3 2 】

結果は図 5 に示したとおりであり、オリゴペプチド T A T - S 216 (特願平 11-269398 号) を週 3 回投与した場合には、腫瘍重量が有意に減少し、抗癌剤 CDDP (図 5 上段) および 5-FU (図 5 下段) の効果が増強されることが確認された。

## 【 0 0 3 3 】

## 【発明の効果】

以上詳しく説明したとおり、この出願の発明によって、DNA 傷害処理による癌細胞の G 2 期チェックポイント機構を特異的に破壊することのできる物質と、この物質を確実にスクリーニングすることのできる方法が提供される。この G 2 期チェックポイント機構破壊物質の処理によって癌細胞は抗癌剤等の抗癌処理に対して感受性となるため、癌治療をより効果的に行うことが可能となる。

## 【 0 0 3 4 】

## 【配列表】

<110> 科学技術振興事業団 (Japan Science and Technology Corporation)

<120> 抗癌療法の増強剤とそのスクリーニング方法

<130> N P 9 9 4 6 4 - Y S

<160> 9

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized opeptide

&lt;400&gt; 1

Tyr Xaa Xaa Pro Ser Xaa Xaa Xaa Asn

1

5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthesized peptide

&lt;400&gt; 2

Tyr Xaa Xaa Pro Xaa Xaa Xaa Xaa Asn

1

5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthesized peptide

&lt;400&gt; 3

Tyr Arg Ser Pro Ser Met Pro Glu Asn

1

5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Synthesized peptide

&lt;400&gt; 4

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Tyr Gly Gly Pro Gly

1                      5                      10                      15  
Gly Gly Gly Asn  
20  
<210> 5  
<211> 22  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthesized peptide  
<400> 5  
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Ala Arg Ser Ala  
1                      5                      10                      15  
Ser Met Pro Glu Ala Leu  
20  
<210> 6  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>  
<223> Synthesized peptide  
<400> 6  
Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Gly Gly Ser Pro Ala  
1                      5                      10                      15  
Met Pro  
<210> 7  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence  
<220>

<223> Synthesized peptide

<400> 7

Leu Tyr Arg Ser Pro Ser Met Pro Glu Asn Leu

1 5 10

<210> 8

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide

<400> 8

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Pro

1 5 10 15

Ala Met Pro Glu Ala Leu

20

<210> 9

<211> 22

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized peptide

<400> 9

Tyr Gly Arg Lys Lys Arg Arg Gln Arg Arg Arg Leu Tyr Arg Ser Pro

1 5 10 15

Ser Met Pro Glu Ala Leu

20

【 0 0 3 5 】

【参考文献】

1. Levine, A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and divisi

- on. Cell 88, 323-331 (1997).
2. Larsen, C.J. Contribution of the dual coding capacity of the p16INK4a/MTS1/CDKN2 locus to human malignancies. Prog. Cell. Cycle. Res 3, 109-124 (1997).
  3. Kawabe, T., Muslin, A.J. & Korsmeyer, S.J. Hox11 interacts with protein phosphatases PP2A and PP1 and disrupts a G2/M cell-cycle checkpoint. Nature 385, 454-458 (1997).
  4. Hartwell, L.H. & Kastan, M.B. Cell cycle control and cancer. Science 266, 1821-1828 (1994).
  5. Paulovich, A.G., Toczyski, D.P. & Hartwell, L.H. When checkpoints fail. Cell 88, 315-321 (1997).
  6. Rowley, R. Reduction of radiation-induced G2 arrest by caffeine. Rad. Res 129, 224-227 (1992).
  7. Yao, S.L. et al. Selective radiosensitization of p53-deficient cells by caffeine-mediated activation of p34<sup>cdc2</sup> kinase. Nature Med 2, 1140-1143 (1996).
  8. DeFrank, J.S., Tang, W. & Powell, S.N. p53-null cells are more sensitive to ultraviolet light only in the presence of caffeine. Cancer Res 56, 5365-5368 (1996).
  9. Wang, S.W., Norbury, C., Harris, A.L., Toda, T. Caffeine can override the S-M checkpoint in fission yeast. J. Cell Sci. 112, 927-937 (1999).
  10. Wang, Q., Fan, S., Eastman, A., Worland, R.J., Sausville, E.A. & O'Connor, R.M. UCN-01: a potent abrogator of G2 checkpoint function in cancer cells with disrupted p53. J. Natl. Cancer. Inst 88, 956-965 (1996).
  11. Walworth, N., Davey, S., Beach, D. Fission yeast chk1 protein kinase links the Rad checkpoint pathway to cdc2. Nature 363, 368-371 (1993).

12. Walworth, N.C., Bernards, R. rad-dependent-response of the chk1-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. Science 271, 353-356 (1996).
13. Matsuoka, S., Huang, M., Elledge, S.J. Linkage of ATM to cell cycle regulation by the Chk2 protein kinase. Science 282, 1893-1897 (1998).
14. Zeng, Y. et al. Replication checkpoint requires phosphorylation of the phosphatase Cdc25 by Cds1 or Chk1. Nature 395, 507-510 (1998).
15. Furnari, B., Rhind, N., Russell, P. Cdc25C mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. Science 277, 1495-1497 (1997).
16. Sanchez, Y. et al. Conservation of the chk1 checkpoint pathway in mammals: linkage of DNA damage to cdk regulation through cdc25. Science 277, 1497-1501 (1997).
17. Peng, C.Y. et al. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of cdc25C on serine-216. Science 277, 1501-1505 (1997).
18. Lopez-Girona, A., Furnari, B., Mondesert, O., Russell, P. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. Nature 397, 172-175 (1999).
19. Nurse, P. Checkpoint pathways come of age. Cell 91, 865-867 (1997).
20. Weinert, T.A. DNA damage checkpoint meets the cell cycle engine. Science 277, 1450-1451 (1997).
21. Russell, P. Checkpoints on the road to mitosis. TIBS 23, 399-402 (1998).

【図面の簡単な説明】

【図 1】

この発明のオリゴペプチド（A）と、化合物（B）の構造である。

【図 2】

この発明のオリゴペプチドとブレオマイシンとを培地に加えて培養したJurkat細胞のDNA量に関するフローサイトメーターの測定結果（左）と、DNA量毎の細胞の割合を示すグラフ（右）である。

【図 3】

図 2 の測定におけるブレオマイシンの代わりにコルヒチンを用いて同様に各細胞周期のDNA量を定量したフローサイトメーターの測定結果である。

【図 4】

T A T - S 216 A の Chk1 および Chk2/Hc C ds1 活性阻害の実験結果を示すプロットング図である。基質となる合成ペプチド（ $10\mu\text{M}$ ）の 4 倍量の T A T - S 216 A（ $40\mu\text{M}$ ）にて Chk1 および Chk2/Hc C ds1 の活性が阻害された。

【図 5】

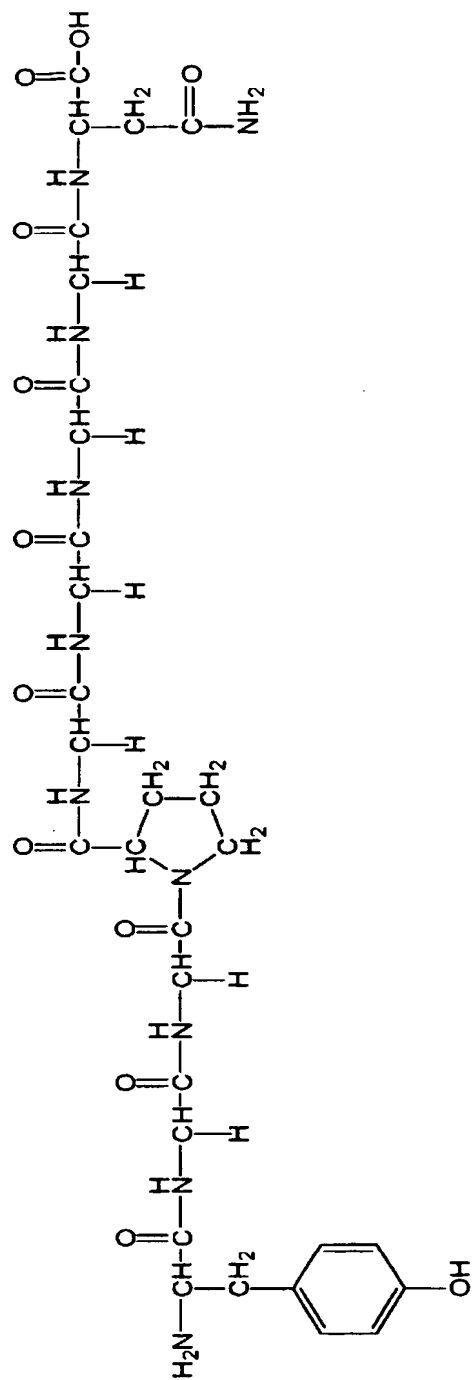
ヒト胃癌細胞株 C O - 4 を皮下接種したヌードマウスに、抗癌剤 CDDP または 5-FU の腹腔内投与とともに、オリゴペプチド T A T - S 216 を週 3 回または 5 回、腫瘍に局所注射した場合の腫瘍重量を示すグラフである。

【書類名】

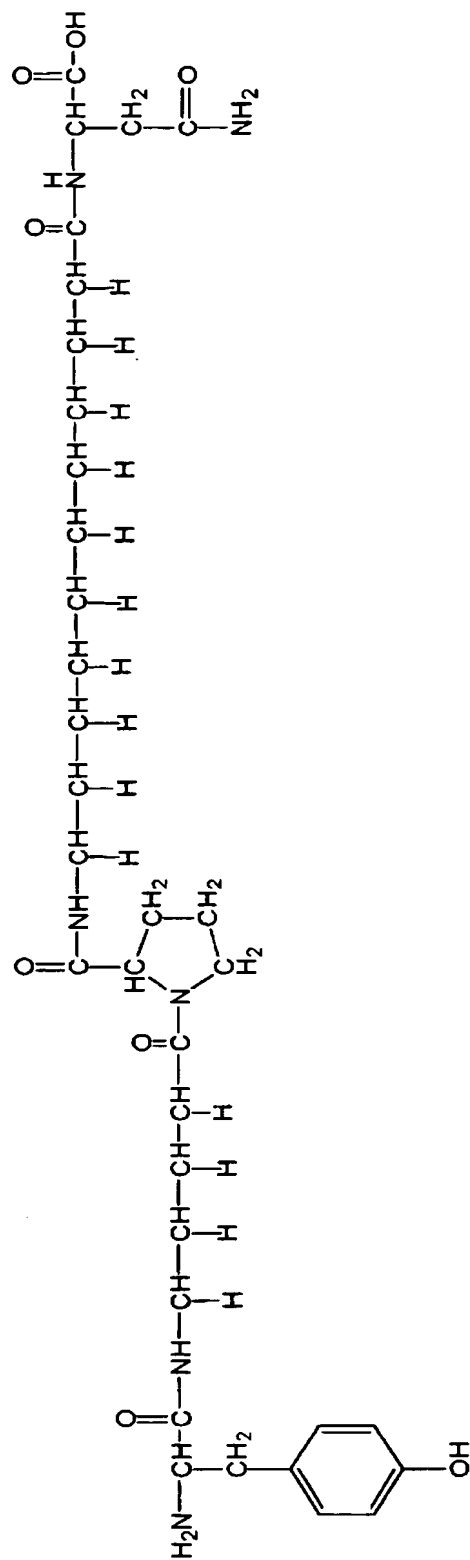
図面

【図 1】



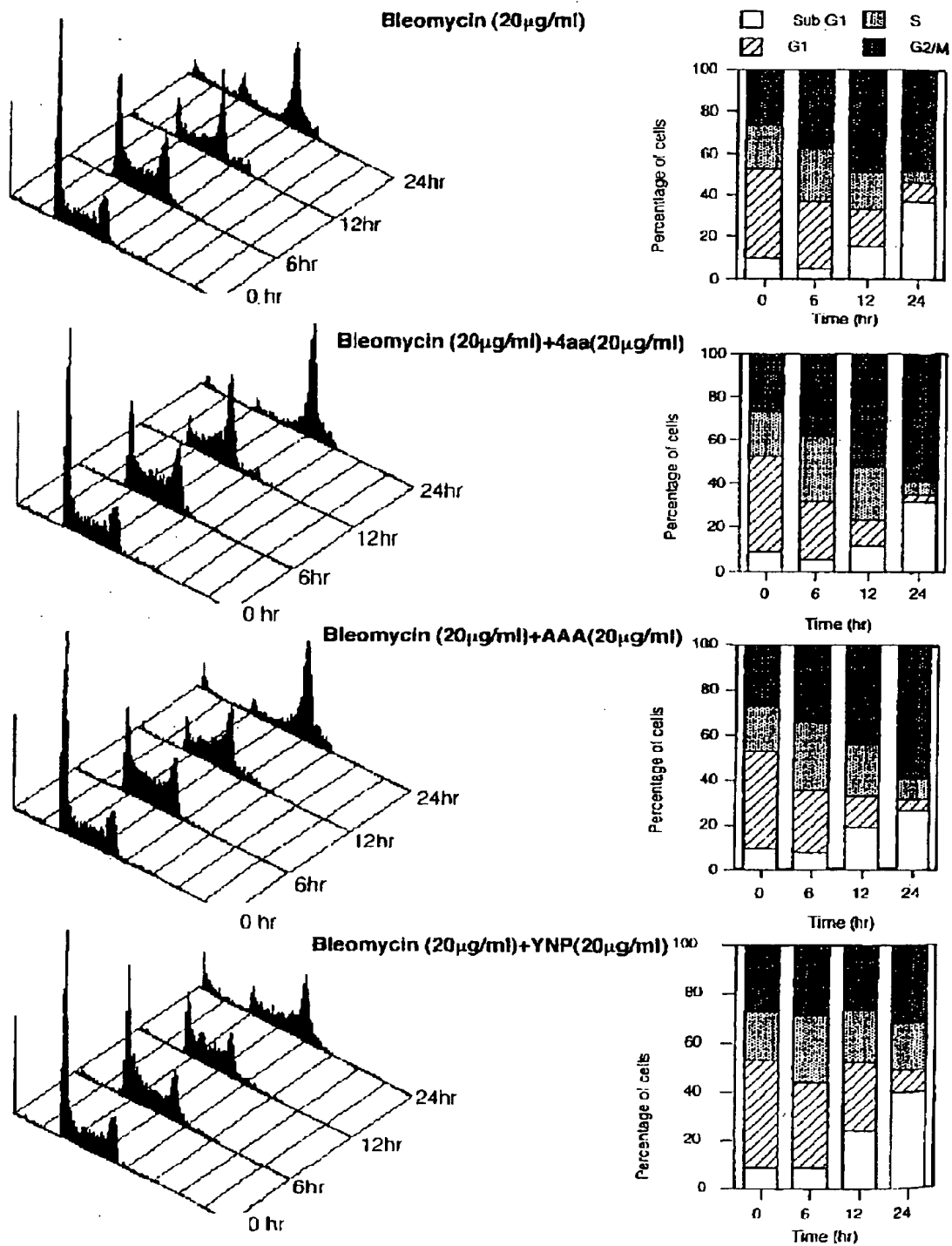


(A)

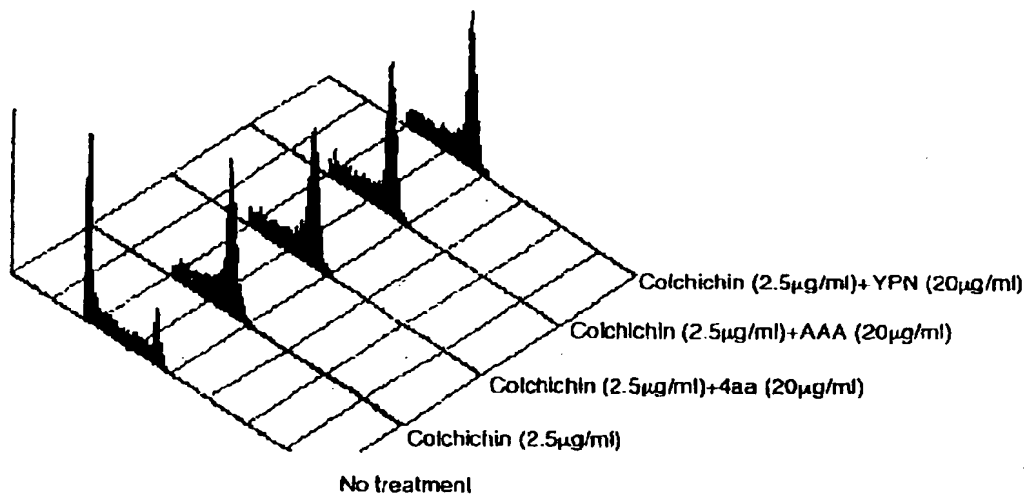


(B)

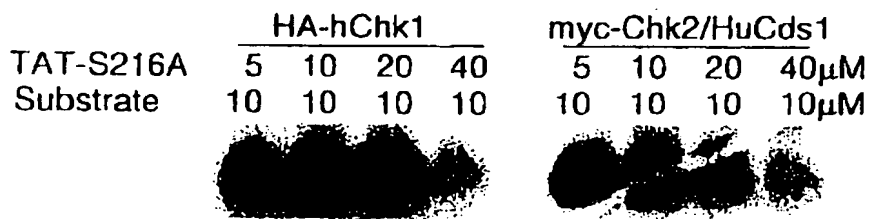
【図 2】



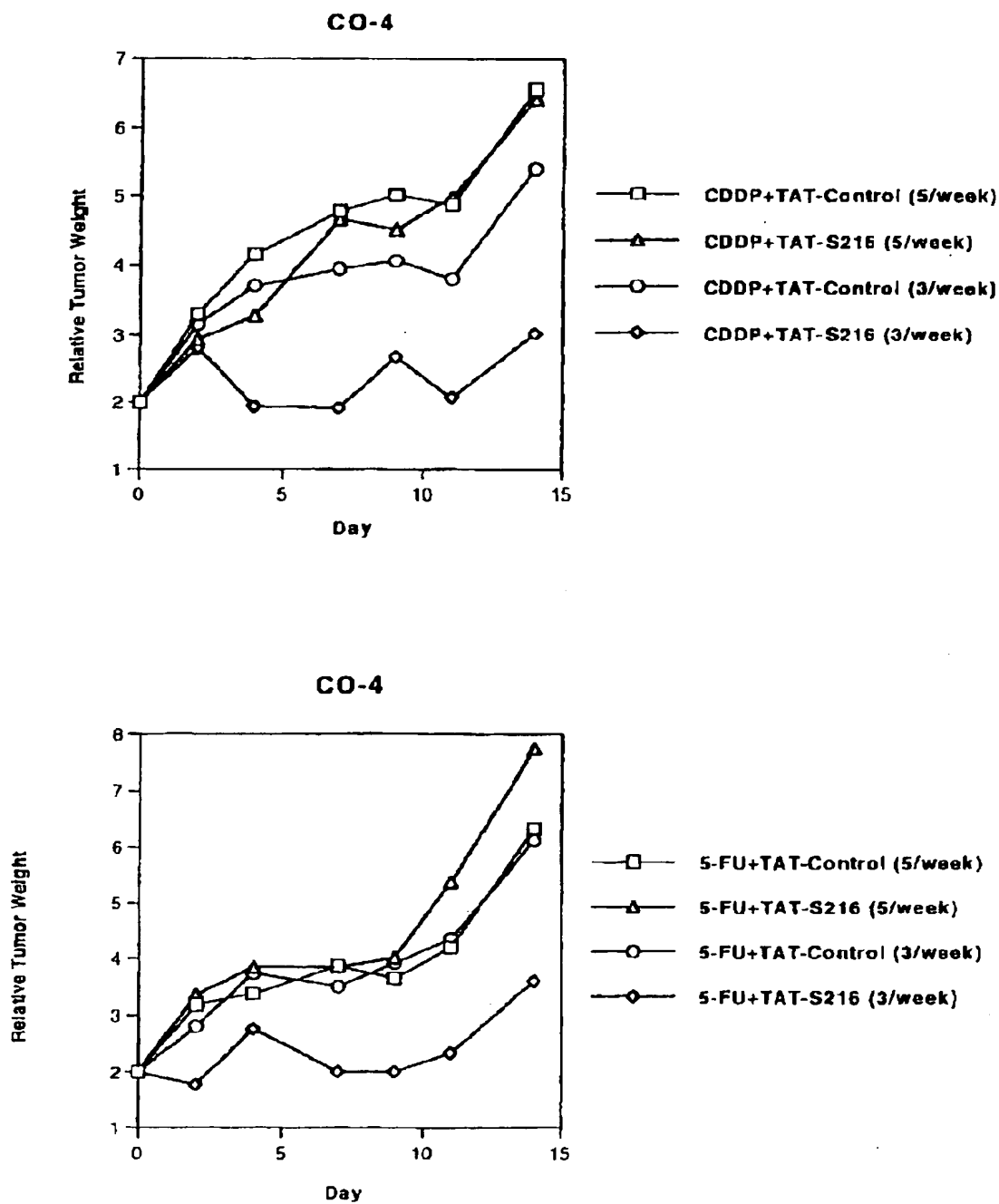
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 DNA 傷害処理による癌細胞の G 2 期チェックポイント機構を特異的に破壊する物質をスクリーニングする方法と、この方法により選択された細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質を提供する。

【解決手段】 配列番号 1 のアミノ酸配列を有するオリゴペプチド、G 2 期停止に関与するリン酸化酵素、および標識化リン供与体からなるリン酸化反応系に候補物質を添加し、オリゴヌクレオチドのリン酸化を阻害する物質を選択する方法、または細胞周期 G 1 期チェックポイント機構に欠損を有する細胞に DNA 傷害性処置を施し、この細胞の培地に候補物質を添加して培養した後、細胞の DNA 量が増加しない物質を選択することを特徴とする方法、並びにこれらの方法によって選択された細胞周期 G 2 期チェックポイント機構破壊物質。

【選択図】 図 1

【書類名】 出願人名義変更届

【提出日】 平成12年 9月19日

【あて先】 特許庁長官 殿

【事件の表示】

【出願番号】 平成11年特許願第340322号

【承継人】

【住所又は居所】 愛知県豊田市渋谷町 1 - 1 - 1 6

【氏名又は名称】 株式会社キャンバス

【承継人代理人】

【識別番号】 100093230

【弁理士】

【氏名又は名称】 西澤 利夫

【電話番号】 03-5454-7191

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 009911

【納付金額】 4,200円

【提出物件の目録】

【物件名】 譲渡証書 2

【物件名】 委任状 1

(E)20001820057



## 譲渡証書

平成 12 年 8 月 28 日

住 所 愛知県名古屋市瑞穂区密柑山町 1-44-1 コーポ岡田 305 号

譲受人 河 邊 拓 己



住 所 愛知県豊田市渋谷町 1-1-16

譲受人 菅 沼 正 司



住 所 埼玉県川口市本町四丁目 1 番 8 号

譲渡人 科学技術振興事業団

理事長 川 崎 雅 弘



下記の特許出願に係る特許を受ける権利の全部を貴殿に譲渡したことに相違ありません。

### 記

1. 特許出願の番号

特願平 11-340322 号

2. 発明の名称

抗癌療法の増強剤とそのスクリーニング方法

2

## 譲渡書

平成12年8月28日

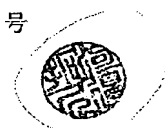
### 譲受人

住所 愛知県豊田市渋谷町1-1-16  
名称 株式会社キャンパス  
代表者 菅沼 正司 殿

### 譲渡人

住所 愛知県名古屋市長区蜜柑山町1-44-1  
コーポ岡田305号

氏名 河邊 拓己



住所 愛知県豊田市渋谷町1-1-16

氏名 菅沼 正司



下記の発明につきまして、私の特許を受ける権利の全てを貴殿に譲渡いたします。

(記)

特許出願番号

平成11年特許願第340322号



(B)20001820967



## 委 任 状

平成 12 年 8 月 28 日

私は、

識別番号 1 0 0 0 9 3 2 3 0 (弁理士) 西 澤 利 夫 氏  
を以て代理人として下記事項を委任します。

1. 平成 1 1 年 特 許 願 第 3 4 0 3 2 2 号 に関する手続
1. 上記出願又は平成 年 願 第 号に基づく  
特許法第 41 条第 1 項又は実用新案法第 8 条第 1 項の規定による優先権の主張  
及びその取下げ
1. 上記出願に関する出願の変更、出願の放棄及び出願の取下げ
1. 上記出願に関する拒絶査定に対する審判の請求
1. 上記出願に関する補正の却下の決定に対する審判の請求
1. 上記出願に係る特許権、実用新案権、意匠権、商標権又は防護標章登録に  
基づく権利及びこれらに関する権利に関する手続（権利維持の管理について  
は除く）並びにこれらの権利の放棄
1. 上記出願に係る特許に対する特許異議の申立て又は商標（防護標章）登録  
に対する登録異議の申立てに関する手続
1. 上記出願に係る特許、特許権の存続期間の延長登録、意匠登録、商標登録、  
防護標章登録又は商標（防護標章）更新登録に対する無効審判の請求に関す  
る手続
1. 上記出願に係る特許権に関する訂正の審判の請求
1. 上記出願に係る商標登録に対する取消しの審判の請求に関する手続
1. 上記各項の手続に関する請求の取下げ、申請の取下げ又は申立ての取下げ
1. 上記各項に関し行政不服審査法に基づく諸手続をなすこと
1. 上記各項の手続を処理するため、復代理人を選任及び解任すること

住 所 愛知県豊田市渋谷町 1 - 1 - 1 6

名 称 株式会社 キャンパス

代 表 者 菅 沼 正 司



## 認定・付加情報

特許出願の番号	平成 1 1 年 特許願 第 3 4 0 3 2 2 号
受付番号	2 0 0 0 1 8 2 0 0 6 7
書類名	出願人名義変更届
担当官	小菅 博 2 1 4 3
作成日	平成 1 2 年 1 1 月 1 5 日

### < 認定情報・付加情報 >

#### 【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
	譲渡証書	1

次頁無

特願平 1 1 - 3 4 0 3 2 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 3 9 6 0 2 0 8 0 0 ]

1. 変更年月日

1 9 9 8 年 2 月 2 4 日

[変更理由]

名称変更

住 所

埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号

氏 名

科学技術振興事業団

特願平 1 1 - 3 4 0 3 2 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 0 4 9 5 6 3 6 ]

1. 変更年月日

2 0 0 0 年 9 月 1 9 日

[変更理由]

新規登録

住 所

愛知県豊田市渋谷町 1 - 1 - 1 6

氏 名

株式会社キャンバス